

学校编码:10384
学号:20520071151019

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

羧基化荧光编码微球的制备及其应用

Preparation and Application of Carboxyl

Fluorescence-encoded Microbeads

张 志 灵

指导教师姓名: 颜 晓 梅 教授

专 业 名 称: 分 析 化 学

论文提交日期: 2010 年 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席:_____

评 阅 人:_____

2010 年 6 月

Preparation and Application of Carboxyl Fluorescence-encoded Microbeads

A Thesis Presented

by

Zhiling Zhang

Supervisor: Professor Xiaomei Yan

Submitted to the Graduated School of Xiamen University

for the Degree of Master of Science

June, 2010

Department of Chemistry, Xiamen University

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

摘要

液相芯片技术又称流式微珠阵列技术,是将溶液中待测物质通过生物分子之间特异性亲和反应结合在类似于细胞大小的经荧光编码的微球体上,利用流式细胞术对同一个微量样本中的多种待测分子同时进行快速定性、定量分析的新一代分子诊断技术平台。检测时,微球颗粒被微量液体传送系统排成单列通过两束激光:一束测定微球自身的颜色从而对被测物进行定性分析,另一束测定微球上报告分子所携带的荧光标记强度从而对被测物进行定量分析。液相芯片是一种非常灵活的多元分析平台,在核酸、蛋白质等生物大分子的大规模分析中具有巨大的应用潜力。

液相芯片技术的载体是表面功能化的荧光编码微球,微球的合成材料有很多,如二氧化硅、聚丙烯酸酯、聚乙烯基吡啶、聚丙烯酰胺等类型,但至今应用较广泛的仍为聚苯乙烯。对微球表面进行各种修饰可以使微球表面带有氨基、羧基、巯基、环氧基等功能基团;通过化学键合作用可将生物分子固定于微球表面从而捕获相应的分析物,再与标记有荧光物质的报告分子结合,通过测定微球表面荧光强度来检测生物样本中待测物的含量。

本论文的主要工作是羧基化荧光编码微球的合成及其在生物样品检测分析中的应用。论文共分四章,第一章为前言,第二章为羧基化聚苯乙烯微球的合成及其荧光编码,第三章为羧基化荧光微球在甲胎蛋白(AFP)检测中的应用,第四章为工作总结与展望。

论文的第一章首先介绍了液相芯片的原理、特点及其应用。随后综述了液相芯片载体聚苯乙烯微球合成以及编码方式,并重点介绍了荧光微球的制备。

第二章为羧基化聚苯乙烯微球的合成及其荧光编码。由于液相芯片中所应用的微球粒径为微米级,因此实验中采用了分散聚合法合成出聚苯乙烯种子微球。本章实验优化十一烯酸、二乙烯基苯(DVB)等反应条件,成功制备了粒径均一的羧基化荧光微球;通过调整荧光物质加入量实现了十二种荧光编码微球的制备。实验结果表明荧光微球具有良好的光热及离子稳定性。通过比较各反应条件对微球的影响以及不同荧光染料制得的荧光微球性质,推测出荧光微球的

制备机理为:十一烯酸和 DVB 对种子微球进行溶胀,同时荧光分子扩散进入种子微球并通过疏水作用以及十一烯酸和 DVB 聚合包覆而固定于微球近表层。

论文第三章是羧基化荧光微球在甲胎蛋白检测分析中的应用。实验中采用双抗体夹心的方法,优化了反应条件,实现了对甲胎蛋白的检测,检测限为 80 pg/mL,表明自制荧光编码微球在液相芯片中具有优异的应用价值。

本论文的主要成果是发展了一种羧基化荧光编码微球的制备方法。首先通过分散聚合法合成出粒径均一的聚苯乙烯种子微球,再通过后修饰法对种子微球进行表面羧基化修饰同时进行荧光编码。合成的羧基化聚苯乙烯微球应用于 AFP 的检测,达到医学检测需求,因此制备的荧光微球可以应用于流式微珠免疫分析。

关键词: 液相芯片; 羧基化荧光编码微球; 生物检测

Abstract

Suspension array, also named as microsphere-based array, is a new clinical diagnostic platform which uses different fluorescence-encoded microbeads coupled with biological probes to capture the analytes for qualitative and quantitative analysis simultaneously in a micro sample with flow cytometry. Through the fluid system, microbeads pass through the laser detection volume one by one for the analysis of flow cytometer. The fluorescence produced from the internal dye is used to decode the microbeads for qualitative analysis; meanwhile the fluorescence signal from the reporter molecules is used for quantitative analysis. The suspension array is a flexible platform and can be used for nucleic acid and protein analysis.

Chemical group functionalized fluorescent microbeads are important carriers in the suspension array. The microbeads could be synthesized from many materials, including silica, polyacrylate, polyvinylpyridine and polyacrylamide, *etc.* And the polystyrene microbeads are the most popular ones with the applications. With the modification of beads, the beads' surface may attach many kinds of chemical groups such as amine, carboxyl, thiol, and epoxy groups. The external chemical groups can be activated to couple with biological probes; then the microbeads coupled with probes can be used to capture the analytes which then bind with fluorescently labelled reporter molecules. The analyte concentration can be determined by detecting the fluorescence intensity of the reporters.

The main work in this thesis was the synthesis of fluorescence-encoded polystyrene microbeads with carboxyl functionalities on the surface and the application of fluorescent microbeads for biological detection. This thesis is composed of four chapters. Chapter one is the overview. Chapter two describes the preparation of carboxyl polystyrene beads and their fluorescence-encoding. Chapter three discusses the application of carboxyl fluorescent microbeads in the detection of alpha-fetal protein (AFP). Chapter four outlooks and forecasts the work.

Chapter one introduces the principle, characteristics and applications of suspension array. An overview of the synthesis and encoding methods of polystyrene beads for suspension array was provided with the emphasis on the fabrications.

Chapter two describes the preparation of carboxyl polystyrene beads and their fluorescence-encoding. As the microbeads employed in the suspension array are in the micron-size, we used the dispersion polymerization for the preparation of polystyrene seed microbeads. In this part, through optimizing the concentration of undecylenic acid and divinyl benzene (DVB), we succeeded in synthesizing carboxyl fluorescent polystyrene microbeads with good monodispersity. Twelve kinds of fluorescence-encoded microbeads were prepared by adjusting the quantities of fluorescent molecules. The photo, thermo, and ionic stabilities were examined and the result indicated that the beads had good stabilities. Based on the effects of different reaction conditions and different microbeads doped with different fluorephores, the mechanism of fluorescent dye doping may be explained as follows: first, undecylenic acid and DVB swelled polystyrene beads, then dyes penetrated the bead surface based on hydrophobic interaction; at last with the crosslinking polymerization of DVB and undecylenic acid, dyes were trapped on the shell of the beads.

Chapter three discusses the application of carboxyl fluorescent microbeads in the detection of alpha-foetal protein. Through rection condition optimization, detection of AFP antigen *via* a sandwich microsphere-based immunoassay yielded a detection limit of 80 pg/mL, demonstrating that the fluorescence-encoded microbeads are efficient in serving as the microcarriers in suspsension array.

In summary, the main contribution of this thesis is providing a simple method for preparing carboxyl fluorescence-encoded microbeads. The micron-sized, monodisperse polystyrene beads were first fabricated with dispersion polymerization. Then with post-modification, carboxyl groups were attached to the beads' surface and beads were coded with inner fluorescence. When tested in AFP detection of biological samples, low detection limit was obtained which was sufficient for clinical diagnosis, indicating the potential application of laboratory-synthesized carboxyl fluorescent microbeads in microsphere-based array technology.

Key words: Suspension array; Carboxyl fluorescence-encoded microbeads; Biological detection

厦门大学博士论文摘要库

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 液相芯片技术简介.....	1
1.1.1 液相芯片技术原理.....	3
1.1.2 液相芯片技术的优点.....	4
1.1.3 液相芯片的应用.....	7
1.2 聚苯乙烯微球的合成.....	8
1.2.1 乳液聚合.....	10
1.2.2 悬浮聚合.....	10
1.2.3 种子聚合法.....	10
1.2.4 分散聚合.....	11
1.3 微球的编码.....	12
1.3.1 空间图案编码技术.....	12
1.3.2 基于有机染料的编码方法.....	13
1.3.3 基于量子点的编码方法.....	14
1.3.4 电子射频编码方法.....	15
1.3.5 物理编码方法.....	15
1.4 荧光微球的制备方法.....	15
1.5 本论文工作的研究背景、设想和研究目的.....	17
1.6 参考文献.....	17
第二章 羧基化聚苯乙烯微球的合成及其荧光编码.....	28
2.1 引言.....	28
2.2 实验部分.....	28
2.2.1 仪器与试剂.....	28
2.2.2 微球表征.....	29
2.2.3 实验步骤.....	30
2.3 结果与讨论.....	34
2.3.1 荧光素微球的粒径及荧光表征.....	34
2.3.2 荧光素微球的荧光编码.....	38
2.3.3 离子强度对荧光素微球的影响.....	38
2.3.4 溶剂极性对荧光素微球泄漏的影响.....	39
2.3.5 罗丹明 6G 荧光微球的粒径及荧光表征.....	40
2.3.6 十一烯酸对荧光微球的影响.....	42

2.3.7 DVB 对荧光微球的影响	44
2.3.8 罗丹明 6G 编码荧光微球的表征	45
2.3.9 罗丹明 6G 微球的光稳定性	47
2.3.10 离子强度对罗丹明 6G 荧光微球的影响	48
2.3.11 温度对罗丹明 6G 荧光微球荧光泄漏的影响	49
2.3.12 荧光微球包被机理讨论	49
2.4 本章小结	52
2.5 参考文献	52
第三章 羧基化荧光微球在甲胎蛋白检测中的应用	56
3.1 引言	56
3.2 实验部分	57
3.2.1 仪器和试剂	57
3.2.2 实验步骤	58
3.3 结果与讨论	61
3.3.1 荧光微球偶联抗体及测试	61
3.3.2 考察荧光微球是否与报告探针产生荧光共振能量转移现象	62
3.3.3 羧基功能性微球在甲胎蛋白检测中的应用	64
3.4 本章小结	64
3.5 参考文献	65
第四章 总结与展望	67
4.1 本文的成果	67
4.2 工作展望	68
附 录	69
在校期间发表的论文	70
致 谢	71

Contents

Abstract in Chinese.....	I
---------------------------------	----------

Abstract in English	III
----------------------------------	------------

Chapte 1 Preface	1
-------------------------------	----------

1.1 Introduction of suspension array	1
1.1.1 Pinciples of suspension array	3
1.1.2 Characteristics of suspension array	4
1.1.3 Applications of suspension array.....	7
1.2 Synthesis of polystyrene beads.....	8
1.2.1 Emulsion polymerization	10
1.2.2 Suspension polymerization	10
1.2.3 Seeded polymerization	10
1.2.4 Dispersion polymerization	11
1.3 Encoding methods for beads	12
1.3.1 Graphical encoding method	12
1.3.2 Organic dyes encoding method	13
1.3.3 Quantum dots encoding method.....	14
1.3.4 Radio-frequency encoding method	15
1.3.5 Physical characteristics encoding method.....	15
1.4 Preparation methods for fluorescent microbeads	15
1.5 The background, plan and aims of this research.....	17
1.6 References.....	17

Chapter 2 Preparations of carboxyl polystyrene beads and their fluorescence-encoding.....	28
--	-----------

2.1 Preface.....	28
2.2 Experimental part	28
2.2.1 Instruments and reagents.....	28
2.2.2 Characterization of beads	29
2.2.3 Experimental approaches	30
2.3 Results and discussion	34
2.3.1 Size distribution and fluorescence chracterization of fluorescein doped beads	34
2.3.2 Fluorescein encoded beads.....	38
2.3.3 The effect of ionic strength on fluorescein doped beads	38
2.3.4 The effect of solvent polarity on the fluorescence leakage of beads.....	39

2.3.5 Size distribution and fluorescence characterization of R6G doped beads.....	40
2.3.6 The effect of undecylenic acid on R6G doped beads	42
2.3.7 The effect of DVB on R6G doped beads.....	44
2.3.8 Characterization of R6G encoded fluorescent beads.....	45
2.3.9 Photostability of R6G doped beads.....	47
2.3.10 The effect of ionic strength on R6G doped beads	48
2.3.11 The effect of temperature on the fluorescence leakage of R6G doped beads.....	49
2.3.12 Discussion of the mechanism for fluorophore encapsulation.....	49
2.4 Conclusion.....	52
2.5 References.....	52
 Chapter 3 The application of carboxyl fluorescent beads in the	
detetion of AFP	56
3.1 Preface.....	56
3.2 Experimental part	57
3.2.1 Instruments and reagents	57
3.2.2 Experimental approaches	58
3.3 Results and discussion	61
3.3.1 Antibody coupling to the beads and the efficiency testing.....	61
3.3.2 FRET detection between bead encapsulated fluorophore and reporter dyes.....	62
3.3.3 The appliction of carboxyl fluorescent beads in the detection of AFP.....	64
3.4 Conclusion.....	64
3.5 References.....	65
 Chapter 4 Conclusion and prospect	67
4.1 Conclusion.....	67
4.2 Prospect.....	68
 Appendix.....	69
 Publications during master study.....	70
 Acknowledgements	71

第一章 前言

1.1 液相芯片技术简介

液相芯片技术又称流式微珠分析技术，是将溶液中待测物质通过生物分子之间特异性亲和反应结合在类似于细胞大小的经荧光编码的微球体上，利用流式细胞术对同一个微量样本中的多种待测分子同时进行快速定性、定量分析的新一代分子诊断技术平台^[1]。液相芯片技术起源于微珠免疫分析，而微珠免疫技术最早可以追溯到1956年Sing和Plotz



图 1.1 Luminex 200 液相芯片仪器

Fig.1.1 Luminex 200 liquidchip

首先报道以胶乳颗粒为载体吸附人IgG，建立起类风湿因子(RF)的胶乳凝聚实验(LAT)^[2]。1977年流式细胞仪首次以微球为载体，将分析对象拓展至溶液中的目标分子^[3]；由于流式细胞仪能够鉴别不同大小和颜色微球，该方法可应用于不同类别微球群的分析。

液相芯片技术是二十一世纪初诞生的新一代分子诊断技术平台，既能保证信息质量，又能提供相对高通量的分析。该技术平台整合了生物检测、乳胶微球荧光编码、微液体传送系统、激光实时记录、先进电脑软件 and 数据处理模式等多种先进技术。它是一个灵活的、开放的技术平台，根据待检测生物分子的不同，液相芯片技术可以根据需要进行相应的构建，从而可以对不同的生物分子进行快速、廉价、准确的检测^[4]。

传统的生物芯片技术是将蛋白质分子有序地固定在滤膜、滴定板和载玻片等固相载体上，用标记了特定荧光抗体的蛋白质等生物分子与芯片作用，再利用激光荧光扫描技术测定其荧光强度，通过荧光强度分析蛋白质与蛋白质的相互作用，从而实现蛋白质功能研究或免疫诊断。但固相载体难于维持蛋白质的天然构象，不利于蛋白质功能研究；而且信息质量的稳定性和重现性比较差，无法实现定量检测，也因此的临床应用中受到较大限制。

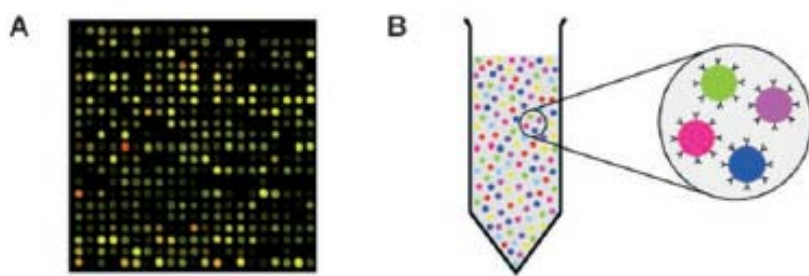


图 1.2 (a)根据地址识别的传统二维芯片；(b)基于颜色编码微球的液相芯片

Fig.1.2 (a) A conventional two-dimensional array, recognition molecules are known from their location on the array. (b) A suspension array is composed of color-encoded particles^[5].

液相芯片与传统生物芯片相比的最大不同之处在于传统生物芯片依靠其承载基片上的坐标定位进行寻址而液相芯片通过内部荧光实现编码定位。液相芯片通过液体混合的方式制备，操作简单、准确；制备芯片再经分装就可得到成千上万个性质完全一致的芯片，克服了平面芯片探针点样时容易发生点样错误、耗时、平行等量加样困难、加样头反复加样易发生样本间污染、重复性差等缺点。另外，由于杂交在悬浮的液相中进行，反应需要时间短，杂交后常不用清洗就可以直接检测，所以检测效率大大高于固相杂交，所用时间从几小时缩短到十几分钟^[6]。

液相芯片是继平面芯片之后的一种新型芯片技术，是一种非常灵活的多元分析平台，在核酸、蛋白质等生物大分子的大规模分析中具有巨大的应用潜力，可用于免疫分析、核酸研究、酶学分析、受体-配体识别分析等众多领域的研究；另外蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-核酸相互作用分析等也都可以在这个平台上实现^[7-9]。鉴于液相芯片技术在高通量定性和定量检测上令人瞩目的优势，目前它在基因组学研究、蛋白质组学研究、药物开发、基础研究和临床诊断等方面的应用十分广泛，近年来以此为平台的产品开发和应用十分活跃，研究者既可以根据研究需要自行制备探针偶联微球，建立反应体系，也可使用种类繁多的商品化试剂盒进行分析。目前流式微珠免疫分析方法作为一种新的液相蛋白定量技术已广泛应用到临床诊断治疗、科研、疾病预防控制中。迄今为止十年间，全球已有数百套基于多指标同步分析(Flexible Multi-Analyte Profiling, xMAP)技术的检测平台用于免疫学、蛋白质、核酸检测、基因研究等领域，该技术已成为一种新的蛋白质组学和基因组学研究工具，也是最早通过美国食品与药物管理局(FDA)

认证的可用于临床诊断的生物芯片技术。

1.1.1 液相芯片技术原理

液相芯片技术的原理并不完全等同于传统意义上的固相生物芯片，它是通过微球内包被的不同比例的荧光染料或者不同大小的微球进行寻址定位，利用不同荧光编码微球进行抗原-抗体、酶-底物、配体-受体的结合反应或及核酸杂交反应；检测时，富集有待测物质的微球体逐一、顺次、高速地通过流式细胞仪的双色激光探测区，微球体本身带有的编码荧光可用来区分不同的特异性结合，对待测物进行定性分析；微球体上报告分子所携带的荧光可对待测物进行定量分析。一个反应孔内可以完成多达100种不同的生物学反应，是继基因芯片、蛋白芯片之后的新一代高通量分子检测技术平台^[10-14]。

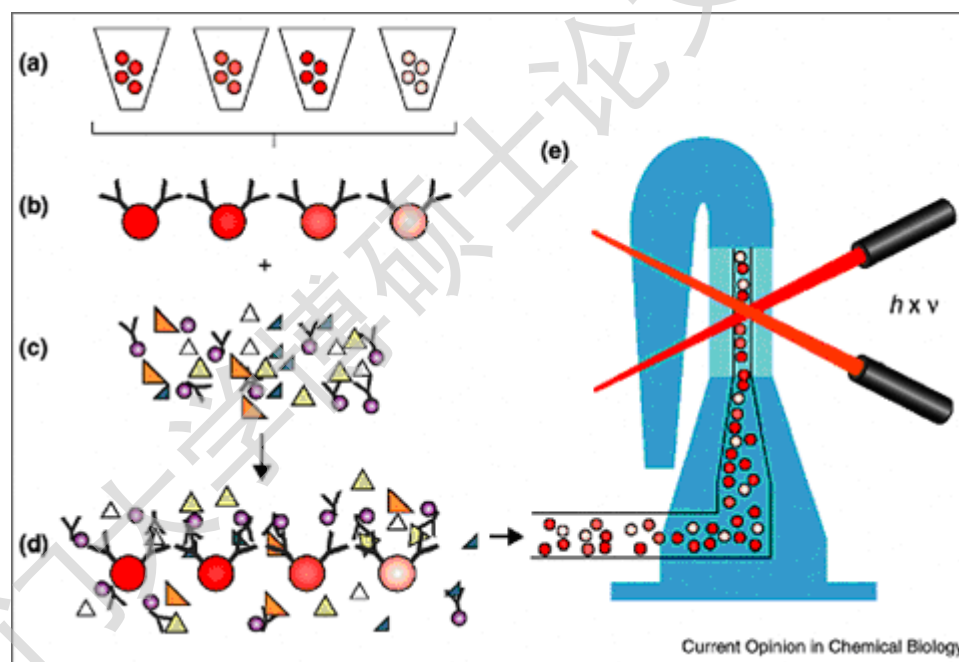


图1.3 液相芯片检测流程图

Fig. 1.3 Detection procedure of suspension arrays

图1.3为微球在生物检测中应用的流程示意图，表面带有羧基的微球经活化后与抗体、抗原、核酸等探针分子共价结合，结合有探针分子微球通过免疫反应或杂交与待测物质及荧光标记的报告抗体结合，最后在液相芯片仪上检测微球内部及表面的荧光强度。

1、荧光编码微球的制备和探针分子的偶联：液相芯片的核心技术是制备不同荧光编码的荧光微球，然后再把针对不同检测物的寡核苷酸或蛋白质探针或其它

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库